



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

**Parasitemia y respuesta de la médula ósea en anemia  
por infección de *P. Falciparum* en el modelo  
experimental *Aotus nancymae***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología  
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**AUTOR**

Diana Melytha PONCE SÁNCHEZ

**ASESOR**

Ricardo Mafalky RODRÍGUEZ TORRES

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

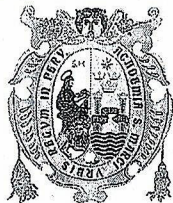
## Referencia bibliográfica

---

Ponce D. Parasitemia y respuesta de la médula ósea en anemia por infección de *P. Falciparum* en el modelo experimental *Aotus nancymae* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2017.

---

1428



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA



"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

Miembro

Lic. Evelina Alejandra Marcelo Carhuavilca

Asesor (a) de Tesis

Mg. Carmen Cecilia Muñoz Barabino

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 45.2 y, Art. 100.13 de la Ley 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Directora de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Mg. José Antonio Paredes Arrascue  
Miembro : Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara  
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 24 de noviembre de 2017, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Parasitemia y respuesta de la médula ósea en anemia por infección de *P.falciparum* en el modelo experimental *Aotus nancymae*"**, para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Bachiller:

**DIANA MELYTHA PONCE SÁNCHEZ**

Habiendo obtenido el calificativo de:

18

(en números)

Dieciocho

(en letras)

Que corresponde a la mención de: *Muy Buena*

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

Presidente  
Mg. José Antonio Paredes Arrascue

Miembro  
Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara

Miembro  
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

Asesor (a) de Tesis  
Lic. Ricardo Mafalky Rodríguez Torres

Av. Grau N° 755, Apartado Postal 529 - Lima 100 - Perú Central Facultad de Medicina (511) 328 3237, (511) 328 3232  
(511)3283238 Central UNMSM (511) 619-7000

Portal Web: <http://medicina.unmsm.edu.pe>

(511)3283238 Central UNMSM (511) 619-7000

## **Dedicatoria:**

A mis padres, por su esfuerzo al brindarme una buena educación. Sobre todo, por su apoyo incondicional.

A mi profesora Bertha, de mi escuela primaria por ser como una segunda madre y contribuir en mi formación.

A los verdaderos amigos, que he encontrado a lo largo de este camino de mi vida.

## **Agradecimientos:**

Al Dr. Christian Baldeviano, por su confianza hacia mi persona, y la oportunidad de ser su tesista.

Al centro de investigación NAMRU-6, por su permiso para realizar la presente tesis.

Al Mg. Jorge Maguiña por su apoyo y orientación en estadística.

Al lic Justo Alegre por su apoyo y orientación en hematología.

Y a todas las personas que de algún otro modo me han ayudado a concluir este presente trabajo.

## **ABREVIATURAS**

**ANOVA:** Analysis of Variance

**AMA1:** Antígeno 1 de la membrana apical.

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**DS:** Desviación estándar

**FVO:** Vietnam Oak Knoll

**IC:** Intervalo de confianza

**IQR:** Rango intercuartílico

**IVITA:** Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura

**NAMRU-6:** Naval Medical Research Unit No. 6

**MINSA:** Ministerio de Salud

**MO:** Médula Ósea

**PPD:** Derivado proteico purificado

**RH5:** reticulocyte-binding protein homologue 5

**RON2:** 'rhoptry neck protein 2'

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	10-13
2. INTRODUCCIÓN .....	14-18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MÉTODOS.....	20-22
5. RESULTADOS .....	23-34
6. DISCUSIÓN.....	35-38
7. CONCLUSIONES .....	39
8. RECOMENDACIONES.....	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41-43
10. ANEXOS.....	44-50



**Anexo a:** Infección del donador y enfrentamiento

**Anexo b:** Manipulación y manejo del mono

**Anexo c:** Monitorización de la parasitemia post-enfrentamiento

**Anexo d:** Monitorización del hematocrito post-enfrentamiento y determinación de los casos de anemia

**Anexo e:** Evaluación de la respuesta de la médula ósea mediante la producción de reticulocitos post-enfrentamiento

**Anexo f:** Criterios del CLSI para la estandarización de valores de referencia según protocolo EP28-A3C (2010)

**Anexo g:** Tabla de descripción de la muestra de estudio

**Anexo h:** Operacionalización de variables.

**Anexo i:** Imágenes

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**TABLA N°1:** Intervalos de referencia para hematocrito y reticulocitos

**TABLA N°2:** Casos de anemia

**TABLA N°3:** Categorización de casos de anemia

**TABLA N°4:** Análisis de Parasitemia versus estado de anemia

**TABLA N°5:** Modelo de regresión crudo y ajustado para el riesgo de anemia.

**TABLA N°6:** Análisis de Parasitemia versus estado de anemia y severidad

**TABLA N°7:** Análisis de Parasitemia versus Respuesta de la médula ósea en el día 25

**TABLA N°8:** Análisis de Respuesta de la Médula ósea frente la Anemia

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

### **GRÁFICO A:**

Seguimiento de hematocrito de acuerdo a grados de anemia.

### **GRÁFICO B:**

Seguimiento de reticulocitos y hematocrito en el grupo no anemia n=5

### **GRÁFICO C:**

Seguimiento de reticulocitos y hematocrito en el grupo anemia no severa  
n=10

### **GRÁFICO D:**

Seguimiento de reticulocitos y hematocrito en el grupo anemia severa n=6

### **GRÁFICO E:**

Seguimiento de reticulocitos y parasitemia en el grupo No Anemia n=5

### **GRÁFICO F:**

Seguimiento de reticulocitos y parasitemia en el grupo anemia no severa  
n=10

### **GRÁFICO G:**

Seguimiento de hematocrito y parasitemia en el grupo anemia severa n=6

# 1. RESUMEN

**Introducción:** Malaria es un problema de salud pública que afecta a millones de personas, genera gran mortalidad de la población mundial. Las más importantes son la malaria vivax y falciparum. En este caso el estudio se centra en la anemia que es una complicación común de la malaria falciparum a lo cual son más susceptibles los niños menores de 5 años, se estima que la mortalidad por anemia severa en la población pediátrica puede exceder el 30 % en algunas regiones de África. Hay muchos estudios enfocados en esta problemática, sin embargo, aún no se tiene muy en claro los mecanismos que contribuye a su desarrollo. **Objetivo:** Evaluar la relación entre parasitemia, respuesta de la médula ósea y anemia por infección de *P. falciparum* en el modelo experimental *Aotus nancymae* de estudios de vacunas conducidos en NAMRU-6 entre el 2012-2016. **Diseño:** Observacional, analítico, longitudinal, retrospectivo. **Materiales y Métodos:** Se usó la data de estudios experimentales en el contexto de evaluación de vacunas contra Malaria falciparum en primates no humanos realizados en el centro de investigación NAMRU-6, realizados en los periodos 2012- 2016. De los cuales se incluyeron al estudio 74 individuos. A partir de la data se identifica y categoriza los casos de anemia en base al intervalo de referencia de hematocrito establecido. Asimismo, se evalúa respuesta de médula ósea a partir del rango de referencia normal de reticulocitos obtenidos con data de 41 individuos, considerado los criterios del CLSI (2010). Los datos recolectados fueron analizados con el paquete estadístico STATA versión 12. Las pruebas estadísticas usadas fueron Chi- cuadrado, Test de Fisher como pruebas de asociación e independencia; Kruskal-wallis, Mann-Whitney para comparación de medias. Y percentiles (97.5) y percentil (2.5) para la determinación de los rangos de referencia. **Resultados:** De los 74 monos, el 35.14% desarrolla alta parasitemia, de los cuales este grupo representa el 38.89% de los casos de anemia, con un  $p=0.266$ . Sin embargo, en este grupo no se observa casos de anemia severa ( $p=0.001$ ). Con respecto a la parasitemia acumulada se halla que es un factor importante para el desarrollo de anemia con un  $OR=2.27$  (IC 95%, 1.18 – 4.64,  $p=0.014$ ), mientras que para la severidad de la anemia *días de parasitemia patente* es un factor con

mayor impacto OR=2.1(IC 95% ,1.4-3.2,p=0.001).Al evaluar parasitemia y respuesta de la médula ósea se encuentra diferencias significativas, se aprecia un clearance total en casos con respuesta de la médula ósea (p=0.02) en el día 25 de seguimiento. Asimismo, se observa diferencias significativas con respecto al *números de días de clearance* entre el grupo con respuesta y no respuesta (medianas respectivas:5 días, 0 días (p=0.002)). No se evidencia respuesta de la médula ósea frente a un estado de anemia, no se muestra diferencias significativas entre los grados de anemia (p<0.05).

**Conclusiones y recomendaciones:** Para el desarrollo de anemia en un estado de infección por *P. falciparum* no importa el nivel de parasitemia, sin embargo, el tiempo de la parasitemia “cronicidad” parece ser un factor a tomar en cuenta. Y con respecto a la respuesta de la médula ósea en un estado de anemia, la médula ósea no responde si no hay un previo clearance total de la parasitemia y también es necesario al menos 5 días de clearance. Se recomienda hacer otros estudios enfocados en la “cronicidad” de la enfermedad. Asimismo, estudios directos de médula ósea antes, durante y después del pico de parasitemia y durante el clearance.

**Palabras clave:** Anemia, *Aotus*, reticulocitos, *P. falciparum*, malaria

# 1. ABSTRACT

**Introduction:** Malaria is a public health problem that affects millions of people and generates high mortality in the world population. The most important are the vivax and falciparum malaria. In this case, the study focuses on anemia, a common complication of falciparum malaria, which have more susceptibility in children under 5 years, it is estimated that severe anemia mortality in the pediatric population may exceed 30% in some regions of Africa. There are many studies focused on this problem, however, the mechanisms contributing to its development still not very clear. **Objective:** Evaluate the relationship between parasitemia, bone marrow response, and anemia against infection of *P. falciparum* in the *Aotus nancymae* experimental model at NAMRU-6 vaccine studies between 2012-2016. **Design:** Observational, analytical, longitudinal, retrospective. **Materials and Methods:** The current study used data from several experimental studies in the context of evaluating vaccine candidates against falciparum malaria in non-human primates conducted at NAMRU-6 research center, made in the periods 2012-2016, with 74 individuals included into the current study. From the data, cases of anemia were identified and categorized based on established reference ranges based on hematocrit. Also, bone marrow response was evaluated based on a normal reference range of reticulocyte obtained from 41 individuals, considering the CLSI (2010) criteria. The collected data were analyzed with the statistical package STATA (version 12). The statistical tests used were Chi-square test or Fisher tests of association and independence, Kruskal-wallis and Mann-Whitney for comparison of means. Furthermore, the percentile 97.5 and percentile 2.5 for determining the reference range was used. **Results:** Of the 74 monkeys, 35.14% developed high parasitaemia, of which 38.89% were anemic ( $p = 0.266$ ). However, in this group, no cases of severe anemia ( $p < 0.001$ ) were observed. With respect to cumulative parasitemia is found to be an important factor for the development of anemia with an OR = 2.27 (95% CI, 1.18 - 4.64,  $p = 0.014$ ), whereas for the severity of the anemia days of patent parasitaemia a factor with greater impact OR = 2.1 (95% CI, 1.4-3.2,  $p = 0.001$ ).

When assessing parasitemia and bone marrow response, significant differences were found, total clearance was observed in cases with bone marrow response ( $p = 0.02$ ) at day 25 of follow-up. Likewise, significant differences were observed regarding the number of days of clearance between the group with response and no response (respective medians: 5 days, 0 days ( $p = 0.002$ )).

No response from the bone marrow was shown against a state of anemia or significant differences between degrees of anemia ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions and recommendations:** For the development of anemia in a state of *P. falciparum* infection, the level of parasitemia was not relevant, however, its duration or "chronicity" seems to be a factor to consider. In regard to the response of the bone marrow in a state of anemia, this does not respond if there is a previous total clearance of parasitemia and of at least 5 days. It is recommended that other studies focus on the "chronic" state of the disease. Also, direct studies of bone marrow before, during and after the peak of parasitemia and during the clearance.

**Keywords:** Anemia, *Aotus*, reticulocytes, *P. falciparum*, malaria

## 2. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad que aqueja a la humanidad desde principios de la historia, pero es en 1880 que Laverian reporta el primer caso en Algeria. Hasta hoy en día representa un problema de salud pública con altas tasas de mortalidad y morbilidad en regiones tropicales y subtropicales.(3) Su agente etiológico es un protozoario del género *Plasmodium*, las especies capaces de producir enfermedad en el humano son: *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* y *knowelsi* que puede pasar de simios a humanos. Sin embargo, el 90% de muertes asociada por malaria se debe a *P. falciparum*.(4)

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2015 estimó 212 millones de casos de malaria en todo el mundo. Y el 90% que fallecen por malaria se concentra en el continente africano y son los niños menores de 5 años que representan el 70% de todas las muertes. (4)(5)

Con respecto a la malaria en la región de las Américas 2000-2012 se observa un decremento significativo de infecciones mixtas y por *Plasmodium falciparum* un 62% que en infecciones por *Plasmodium vivax* (60%). Los países están en fase de eliminación o en fase de control, Perú se encuentra dentro de la fase de control.(6)

En Perú el año 2014 según el Sistema Nacional de Vigilancia epidemiológica en Salud Pública – MINSA la incidencia acumulada (I.A) para *P.falciparum* ha sido de 18.96 por cada 100 000 habitantes en tanto que para *P.vivax* muestra un I.A de 121.35. Siendo Loreto la región que concentra más casos. Según la OPS la proporción de casos en niños menores de 15 años ha incrementado del 36% (2009) al 40% en 2011.(7)

De acuerdo al Reporte de Malaria 2014, la Región Loreto y Madre de Dios son las zonas de alta transmisión (>1 casos por 1000 habitantes). Los agentes etiológicos presentes son *P. falciparum* y *P. vivax* con 16% y 84% respectivamente. Y entre los vectores están: *An. albimanus*, *An. Darlingi*.(5)

En cuanto a la malaria y las zonas de transmisión, se sabe que las zonas de baja transmisión la mortalidad por malaria falciparum aumenta con la densidad de parásitos,



>100 000/l (~ 2,5% de parasitemia), mientras que en las zonas de alta transmisión densidades mucho más altas de parásitos pueden ser toleradas, sin embargo, son los niños <5 años y visitantes de cualquier edad de zonas no endémicas los más vulnerables.

En los adultos el riesgo a desarrollar malaria severa aumenta en caso de ser mujer embarazada entre el segundo y tercer trimestre, pacientes con VIH/SIDA y en personas que han sido sometidas a esplenectomía.

Las características clínicas de malaria severa y comunes complicaciones en niños son: malaria cerebral, anemia severa, distrés respiratorio (acidosis) e hipoglucemia.(8)

En cuanto a la anemia severa, los casos se observan más en las zonas holoendémicas (prevalencia >50% entre los niños) y en zonas de moderada transmisión (prevalencia entre 11-50% durante mayor parte del año).

En la clínica se observa una severa anemia normocítica, hemoglobina < 5g/dl y un hematocrito <15 %. Mientras que en los adultos se considera una hemoglobina < 7g/dl y un hematocrito menor a un 20%. (5)

### **Modelo Animal Primate no humano: *Aotus***

También denominados monos búho, monos nocturnos o douroucoulis. Según la clasificación taxonómica pertenecen a la familia Cebidae, a la subfamilia Aotinae. Son monos propios de Latinoamérica. Son pequeños, monógamos, de cola prensil, antropoides, de hábitos nocturnos, su peso promedio es de 1kg.(9) (10) (27). Son muy importantes en investigación para estudios en malaria, oncogénesis viral, estudios de toxicidad, oftalmología, estudios neurobiológicos, entre otros.(10)

Así por ejemplo con respecto a estudios hematológicos se sabe que muestran mucha similitud con respecto al humano, por ejemplo, en 1925 se sabía que las células rojas de los primates no humanos tenían antígenos similares. En 1940, Landsteiner y Winer descubrieron el factor Rh en monos Rhesus, esto motivo al estudio de la sangre de otros

primates no humanos. Hoy en día se sabe que no existe una separación clara entre los grupos sanguíneos del tipo simio y de tipo humano (Swindler, 1998).(11)

Por otro lado, con respecto a los estudios de malaria se han utilizado varias especies de primates no humanos, sin embargo, los modelos susceptibles a *P.falciparum*, *vivax* que hoy en día son motivo de pandemia mundial son el modelo *Aotus* y *Saimiri*, dado a ello la comunidad científica mundial se centra en ellos para el desarrollo de estrategias de vacunas para prevenir la malaria. El modelo *Aotus* es recomendado para el ensayo de vacunas contra malaria dado a la similitud inmunológica con los humanos. Ello lo evidencia la secuencia conservada de genes que expresa la estructura de la cadena alfa del receptor de la célula T, muestra una similitud mayor al 80% con el TCR humano. (11)

Asimismo, el género *Aotus* presenta variada capacidad de servir como hospedadores de las diferentes malaria humanas en los diferentes estadios: esporozoíto, merozoítos del estadio hepático o eritrocítico. También el modelo *Aotus* es significativo para estudios de anemia severa, drogas antimaláricas, estudiar mejor la patogénesis de la enfermedad. (5) Así la primera infección de *Aotus* con *P. falciparum* se reportó en 1967 con el objeto de estandarizar drogas antimaláricas.

Por otro lado, muchas cepas de Plasmodium han sido adaptadas para desarrollarse en *Aotus* por pasajes lineales de estadios trofozoítos. Por ejemplo, la cepa Vietnam Oak Knoll (FVO), originalmente aislada de un soldado de Vietnam quien fue admitido en el Hospital Naval Oak Knoll en junio de 1968. El parásito se pasó a un mono *Aotus* y se ha mantenido bien pasando a otro *Aotus* o congelando la sangre. La cepa es resistente a cloroquina, los animales infectados son tratados con mefloquina. Por pasajes seriados ha aumentado su virulencia y ha perdido su capacidad de producir gametocitos. Es la cepa estándar para el ensayo de vacunas contra malaria falciparum.(12) Otra cepa es la FCH4 aislada en Filipinas y adaptada a los monos *Aotus* a partir de un cultivo in vitro, tampoco produce gametocitos. (12)

En el Perú contamos con el modelo *Aotus nancymae*, *A. vociferans* que pueden ser usados con diferentes cepas de *P.falciparum*.(10) *Aotus nancymae* se encuentran en Perú y Brazil, presentan 54 cromosomas, esta es la especie que más se usa en los laboratorios y se traen del centro de IVITA de Iquitos, y se ha visto que son resistentes a malaria falciparum.(11)

### **Posibles explicaciones para la anemia por *P. falciparum***

Casos de anemia severa por *P. falciparum* en niños menores de 5 años se han reportado incluso a pesar de presentar bajos niveles de parasitemia. Es así que el presente estudio se enfoca en la anemia por malaria, pues aún hoy no se conoce claramente los diversos mecanismos fisiopatológicos implicados en la interacción entre malaria y anemia. Así por ejemplo, se cuenta con estudios que mencionan “*que la densidad parasitaria no es suficiente respuesta para los cuadros de anemia severa*(13)”, más aún, otras investigaciones indican que “*los cuadros de anemia severa se pueden manifestar una semana después de tratamiento o después del clearance*(14)”. Siendo en otros estudios los mecanismos contribuyentes, el secuestro esplénico(15)(16)(17), lisis de eritrocitos no parasitados por adherencia de antígenos parasitarios en la membrana, apoptosis de eritrocitos no parasitados ya sea por alteraciones a nivel de la membrana como exposición de la fosfatidilserina o alteración por exceso de exposición a radicales libres como respuesta a la infección (18)(19)(20), al desbalance en la respuesta inmune entre la respuesta celular y humoral (21), a la respuesta ineficaz de la médula ósea (22), a la diseritropoyesis (16), la presencia de hemozoína en médula ósea entre otros (23)(24). Para el desarrollo de la presente investigación, se evalúan algunos factores como la parasitemia, la respuesta de la médula ósea a través de un estudio de seguimiento con un modelo animal de primates no humanos.

Si bien en Latinoamérica, incluido Perú el principal agente de malaria es *P. vivax* y el reporte de mortalidad por malaria falciparum en niños es mucho menor a los reportes del continente africano. A nivel mundial el de mayor preocupación es la malaria falciparum relacionada a la mortalidad que produce, por ello, existe mayor investigación en

modelos animales para los ensayos de vacunas, como es el caso del centro de investigación NAMRU-6. Aprovechando este contexto, la importancia del tema y el apoyo de este centro de investigación decidimos estudiar la anemia por malaria falciparum en el modelo experimental *Aotus nancymaeae*.

Este estudio permitió realizar un monitoreo desde la infección hasta la manifestación de la enfermedad, por seguimiento diario de la parasitemia, el hematocrito, y la respuesta de la médula ósea mediante el recuento de reticulocitos en sangre periférica. Lo que plantea el estudio es evaluar la relación entre parasitemia, la respuesta de la médula ósea y anemia en un estado de infección por *P. falciparum*, a través del modelo experimental *Aotus nancymaeae*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General:**

Evaluar la relación entre parasitemia, respuesta de la médula ósea y anemia por infección de *P. falciparum* en el modelo experimental *Aotus nancymae* de estudios de vacunas conducidos en NAMRU-6 entre el 2012-2016.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- 3.2.1 Establecer los intervalos de referencia de hematocrito en *Aotus nancymae*.
- 3.2.2 Determinar anemia en *Aotus nancymae* infectados con *P. falciparum*.
- 3.2.3 Determinar nivel de parasitemia alto, bajo en *Aotus nancymae* infectados con *P. falciparum*.
- 3.2.4 Establecer los intervalos de referencia de reticulocitos en *Aotus nancymae*
- 3.2.5 Estudiar la relación entre respuesta de la médula ósea, parasitemia y anemia.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Diseño y Tipo de investigación

Observacional, analítico, longitudinal, retrospectivo

### 4.2. Población y muestra:

La población son Primates no humanos: *Aotus nancymae* juveniles o adultos procedentes de IVITA. La muestra son *Aotus nancymae* infectados con *Plasmodium falciparum* procedentes estudios de ensayos de vacuna contra malaria falciparum en el centro de investigación NAMRU-6, realizados en los periodos 2012- 2016.

#### 4.2.1. Criterios de inclusión:

- Peso por mono >620 gramos
- Monos con pruebas bioquímicas y hemograma dentro del intervalo de referencia.
- No reactivo a la prueba de tuberculina
- Negativo por serología a la *P. falciparum*
- Mono *Aotus nancymae* infectado con *P. falciparum* que pertenezca a uno de los estudios 2012-2016, cuyo objetivo fue evaluar un candidato a vacuna contra *P. falciparum*.

#### 4.2.2. Criterios de exclusión:

- Primates hembras preñadas
- Monos con un hematocrito basal menor al 30%
- Sin seguimiento después del día 21 post-infección y no anemia.
- Monos con microscopía negativa durante todo el estudio, confirmados o no por PCR.

### **4.3 Técnicas e instrumentos:**

- Infección del donador y enfrentamiento: Manipulación y manejo del mono
- Monitorización de la parasitemia post-enfrentamiento
- Monitorización del hematocrito post-enfrentamiento y determinación de casos de anemia.
- Evaluación de la respuesta de la médula ósea mediante la producción de reticulocitos post-enfrentamiento: Coloración y recuento de reticulocitos, estandarización de valores de referencia y corrección de recuento de reticulocitos.

#### **4.4 Plan de recolección y análisis de datos**

Esta investigación empieza a partir de la evaluación de la data de estudios experimentales en el contexto de evaluación de vacunas contra *Malaria falciparum* en primates no humanos realizados en el centro de investigación NAMRU-6, realizados en el periodo 2012-2016. Con la fusión de la data de estos estudios se evaluará el primer objetivo, mientras con la data de los dos últimos estudios se evaluará la respuesta de la médula ósea. Antes de proceder a evaluar la data se realizó la estandarización de valores de referencia con respecto a hematocrito y recuento de reticulocitos para establecer estado de anemia y respuesta eficaz o ineficaz de la médula ósea, siguiendo los criterios recomendados del CLSI: Protocolo EP28-A3C. Y para el análisis de datos se usará las siguientes herramientas estadísticas:

- Histogramas, shapiro-wilk, q-q plot y medidas de apuntamiento para evaluar normalidad de las variables.
- Test de comparación de medias: ANOVA, Kruskal -wallis, Mann-Whitney, T-student o Test de Fisher.
- Percentiles para determinación de los rangos de referencia
- Modelos de regresión para ajustar variables.

#### **4.5 Consideraciones éticas**

El presente proyecto es un estudio anidado a otro trabajo de investigación realizado en NAMRU-6, y el uso y manejo de animales fue aprobado por el Comité de Ética de dicho centro de investigación.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinación de intervalos de referencia para hematocrito y reticulocitos en monos *Aotus nancymae*.

Con respecto a los intervalos de referencia tanto de reticulocitos como hematocrito, se aplicaron las recomendaciones del CLSI, según el protocolo EP28-A3C (2010)(25). Se trabajó con resultados únicamente de individuos sanos (la definición de individuo sano fue hemograma y pruebas bioquímicas normales, además de prueba PPD no reactiva).

Para obtener los intervalos de referencia de hematocrito se evaluó la data de 56 individuos y en reticulocitos se trabajó con 41. Todos los individuos considerados en su especie como juveniles o adultos y no se hizo distinción de acuerdo a sexo.

Una vez calculado los valores, se aplicó un intervalo de confianza del 90%, tanto para el límite inferior como el superior. En la tabla 1, se muestran los valores hallados:

**TABLA N° 1: Intervalos de referencia para hematocrito y reticulocitos**

	Media	SD	Intervalo de referencia	IC 90% Límite inferior	IC 90% Límite superior
<b>Hematocrito (%) (n=56)</b>	49	5	39-60	39-43	58-60
<b>Reticulocitos (%) (n=41)</b>	3.2	1	1.9-5.8	1.9-2.1	5.0-5.8

**Fuente: ELABORACIÓN PROPIA.** Se usó valores basales de monos, previa infección con *P. falciparum* procedentes de los estudios 1,2,3 para el caso de hematocrito y estudios 4,5 para el caso de reticulocitos. Estos resultados fueron corroborados con la evaluación del hd3 de los 119 monos de los estudios 1 al 5. Asimismo, con contrastado con literatura de otros estudios.

## **5.2 Determinación y categorización de casos de anemia.**

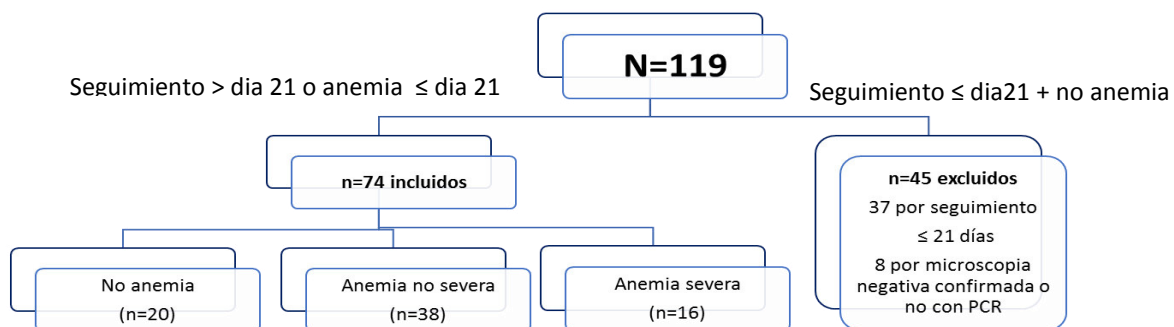
Al integrar los datos de 5 estudios realizados previamente, se logra completar una muestra de 119 monos. Dicha data corresponde a información de estudios experimentales longitudinales.

Se obtiene la información de hematocritos, medidos de manera interdiaria a partir del tercer día de estudio (=d3) hasta el día 35 de seguimiento (=d35). A partir de la determinación de los intervalos de referencia de hematocrito en monos, se define como caso de anemia a aquellos cuyo hematocrito se encuentra por debajo del intervalo de referencia establecido (hematocrito menor a 39%).

La determinación de caso de anemia, a partir de la data de seguimiento se definió como aquellos que presentaran dos hematocritos consecutivos menores de 39% a partir del día 13 de seguimiento=d13.

El criterio de partir del día 13 de seguimiento, está basado en las observaciones correspondientes a otros estudios que evidencian la baja de hematocrito en un estado de infección con *P.falciparum* en similares condiciones en el modelo *Aotus*, es a partir de la segunda semana (26)(27). Además, la media del periodo prepatente (periodo de tiempo en días hasta la aparición de la primera parasitemia evidente por microscopia) en el estudio fue de 9.4 días (IC 95% 8.3- 10.6), por lo cual, se opta tener mayor énfasis en la evaluación de hematocritos a partir del día 13 de seguimiento.

## ESQUEMA N°1: Selección de individuos incluidos en el estudio



**TABLA N° 2: Casos de anemia**

Casos	Frecuencia	Porcentaje
No anemia	20	27.02
Anemia	54	72.97
Total	74	100

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

De 74 monos, ingresados al estudio de anemia, 54 individuos, (72.97 %) presenta anemia.

**TABLA N°3: Categorización de casos de anemia**

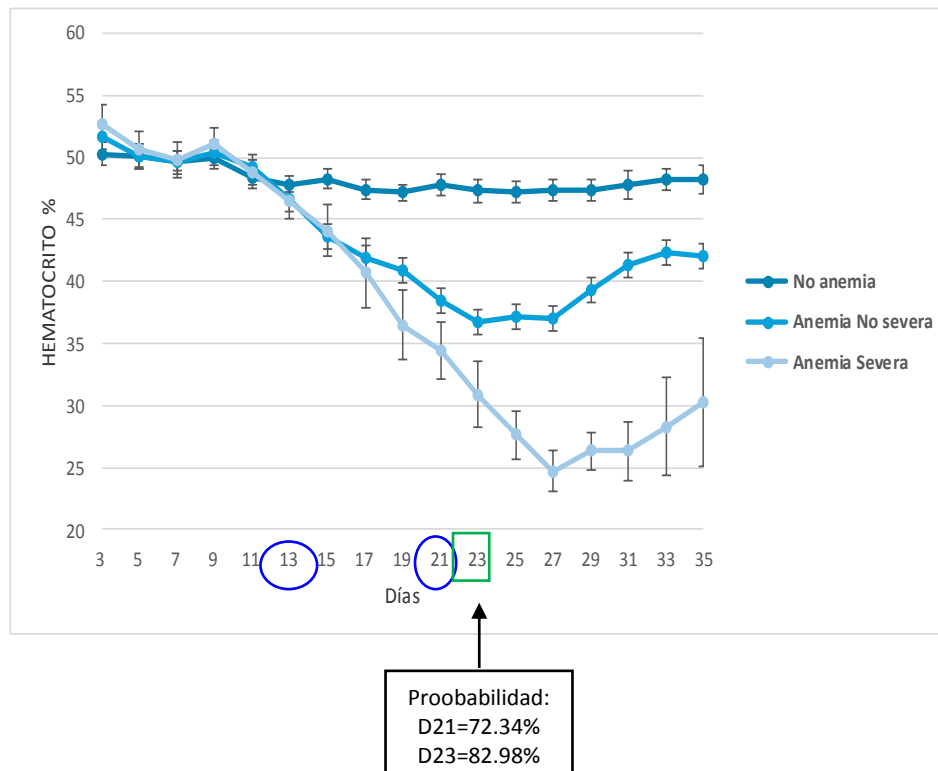
Casos	Frecuencia	Porcentaje
Anemia no severa	38	70
Anemia Severa	16	30
Total	54	100

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

Se definió como casos de anemia severa, a aquellos que durante el seguimiento, en algún momento la caída del hematocrito llegó a ser menor o igual al 50% de la media normal de hematocrito, para este caso se definió como anemia severa cuando el hematocrito llegó a valores  $\leq 25$  %. En este estudio los casos de anemia severa representan el 21.62% del total de los casos.

A continuación, se muestra el seguimiento de hematocrito interdiario desde el día 3 de estudio hasta el día 35 de seguimiento, en los diferentes grupos de acuerdo a los grados de anemia.

**GRÁFICA A: Seguimiento de hematocrito de acuerdo a grados de anemia**



**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.**

En la gráfica, se muestra las medias por día con su respectivo error estándar. El tamaño de muestra trabajada en este caso fue  $n=74$ . Se observa que a partir del día 21, ya se empieza a diferenciar los 3 grupos, sin embargo, es en el día 23 en que la medida del hematocrito muestra una mayor probabilidad de correcta clasificación, de acuerdo al análisis en base a 47 muestras que tienen seguimiento hasta el final del estudio.

## **6.3 Evaluación de la variable parasitemia**

### **6.3.1 Determinación del nivel de parasitemia**

Para el estudio se definen 02 niveles de parasitemia: alto y bajo. El nivel alto de parasitemia corresponde, cuando el pico de parasitemia durante el seguimiento alcanzó valores  $\geq 200\ 000$  par/ul.

El nivel bajo de parasitemia, es cuando el pico de parasitemia alcanzado durante el seguimiento no sobrepasa 200 000 par/ul. De los 74 monos evaluados, 48 individuos (64.86%) desarrollaron baja parasitemia, mientras que 26 monos (35.14%) desarrollo alto parasitemia. En los casos de parasitemia baja, se incluyen además aquellos casos de parasitemia subpatente.

Otras variables tomadas en cuenta para evaluar la parasitemia en relación a anemia fueron: Parasitemia total acumulada y días de parasitemia patente. Que son descritas en las tablas 4, 5 y 6.

**TABLA N°4: Análisis de Parasitemia versus estado de Anemia**

	Anemia(n=54)		No Anemia(n=20)		Total	p valor
<b>*Pico de parasitemia</b> (Mediana, IQR)	173 730.6	(64 473 .68 - 291 100)	21994.67	(960 - 188 224.4)	134 266.7 (32 156.25 - 280 000)	0.001
<b>*Parasitemia total acumulada</b> (Mediana,IQR)	551 032.5	(281 508.7 - 723 978.1)	65 739.34	(1650 - 378 066.9)	410 956.8(101 720.6 - 679 080)	0.001
<b>Edad en meses</b> (Mediana,IQR)	19	(15 - 24)	16	(13.5 - 20)	18 (14 - 23)	0.048
<b>Periodo prepatente</b> (Mediana,IQR)	9	(7 - 12)	12.5	(10 - 29)	10.5 (7 -13)	0.001
<b>Peso basal</b> (Mediana,IQR)	870	(762 - 990)	895	(734 - 1010)	870 (758 - 990)	0.794
<b># de días de parasitemia patente</b> (Mediana,IQR)	13	(9 - 15)	10	(2 - 12)	11.5 (9 - 15)	0.003
<b>Nivel de parasitemia</b> (n,%)						0.266
<b>Alta parasitemia</b> (>=200 000par/ul)	21	38.89	5	25.00	26 (35.14)	
<b>Baja parasitemia</b> (<200 000 par/ul)	33	61.11	15	75.00	48(64.86)	
<b>Sexo</b> (n, %)						0.439
Macho	19	35.00	9	45.00	28(37.84)	
Hembra	35	65.00	11	55.00	46(62.16)	
<b>Tipo de estudio</b> (n,%)						0.628
Estudio 1	12	22.22	6	30.00	18(24.32)	
Estudio 2	11	20.37	3	15.00	14(18.92)	
Estudio 3	10	18.52	2	10.00	12(16.22)	
Estudio 4	16	29.63	5	25.00	21(28.38)	
Estudio 5	5	9.26	4	20.00	9(12.16)	
<b>Estado de inmunizacion</b> (n,%)						0.121
inmunizado	40	74.07	18	90.00	58(78.38)	
naïve	14	25.93	2	10.00	16(21.62)	

**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.**

Las variables con p valor significativos fueron ajustadas mediante regresión logística, con previo análisis de diagramas DAG para identificar variables confusoras.

**\*Expresada en unidades de par/ul**

**Valores “p” obtenidos por prueba Mann Whitney, test Fisher o chi-cuadrado.**

En la TABLA N°4 se indica que hay diferencias significativas ( $p<0.001$ ) entre la parasitemia total acumulada en los casos con y sin anemia. En relación a los niveles de parasitemia no hay diferencias significativas, sin embargo, si se evidencian diferencias con respecto a los días de parasitemia patente ( $p<0.05$ ).

**TABLA N°5: Modelo de regresión crudo y ajustado para el riesgo de anemia**

<i>Modelo de regresión crudo y ajustado para riesgo de anemia</i>						
	ORc	IC 95%	p valor	ORa	IC 95%	p valor
Log Parasitemia total acumulada	2.27	1.44-3.57	0.001	2.35	1.18-4.64	0.014
Edad en meses	1.02	0.95-1.09	0.516	0.97	0.91-1.04	0.476
Periodo prepatente	0.85	0.77-0.94	0.001	0.93	0.79-1.09	0.387
sexo	1.5	0.53-4.27	0.441	1.37	0.32-5.82	0.665
Estado de inmunización	3.15	0.64-15.33	0.155	1.36	0.2-9.27	0.747
Tratamiento antes del final del estudio	4.71	1.49-14.89	0.008	0.53	0.07-3.57	0.08

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ORc: OR crudo

ORa: OR ajustado



**TABLA N° 6: Análisis de parasitemia versus estado de anemia y severidad**

	Anemia No severa(n=38)		Anemia Severa(n=16)		No anemia(n=20)		Total	p valor
<b>*Pico de parasitemia</b> (Mediana,IQR)	225 252.4	(60 000-366 377.6)	118 155.7	(69 105.77 - 176 805.2)	21 994.67	(960 - 188 244.4)	134 266.7 (32 156.25 - 280 000)	0.001
<b>*Parasitemia total acumulada</b> (Mediana,IQR)	551 032.5	(294 562.8 - 820 145.5)	581 063.9	(280 005.4 - 688 556.6)	65 739.34	(1650 - 378 066.9)	410 956.8(101 720.6 - 679 080)	0.001
<b>Edad en meses</b> (Mediana,IQR)	19.5	(16 - 27)	19	(15 - 23.5)	16	(13.5 - 20)	18 (14 - 23)	0.125
<b>Periodo prepatente</b> (Mediana,IQR)	8.5	(6-12)	10.5	(7 - 13)	12.5	(10 - 29)	10.5 (7 -13)	0.002
<b>Peso basal</b> (Mediana,IQR)	876.5	(763 -1000)	822	(749.5 -924)	895	(734 - 1010)	870 (758 - 990)	0.382
<b># de días de parasitemia patente</b> (Mediana,IQR)	11	(9 - 15)	14.5	(13.5 - 15.5)	10	(2 - 12)	11.5 (9 - 15)	0.001
<b>Nivel de parasitemia</b> (n,%)								0.001
<b>Alta parasitemia</b> (≥200 000par/ul)	21	55.26	0	0.00	5	25.00	26 (35.14)	
<b>Baja parasitemia</b> (<200 000 par/ul)	17	44.74	16	100.00	15	75.00	48(64.86)	
<b>Sexo</b> (n, %)								0.466
Masculino	15	39.47	4	25.00	9	45.00	28(37.84)	
Femenino	23	60.53	12	75.00	11	55.00	46(62.16)	
<b>Tipo de estudio</b> (n,%)								0.350
Estudio 1	6	15.79	6	37.50	6	30.00	18(24.32)	
Estudio 2	8	21.05	3	18.75	3	15.00	14(18.92)	
Estudio3	9	23.68	1	6.25	2	10.00	12(16.22)	
Estudio 4	10	26.32	6	3.75	5	25.00	21(28.38)	
Estudio 5	5	13.16	0	0.00	4	20.00	9(12.16)	
<b>Estado de inmunizacion</b> (n,%)								0.589
inmunizado	27	71.05	12	75.00	17	85.00	56(75.68)	
naïve	11	28.95	4	25.00	3	15.00	18(24.32)	

**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.**

✱Expresada en unidades de par/ul

**Valor “p” obtenido a partir de la prueba Kruskal-Wallis o por Test de Fisher**

En **TABLA N° 6** muestra que todos los casos de anemia severa en este estudio presentan baja parasitemia, mientras que los todos los casos de alta parasitemia (35.14%) no desarrollan anemia severa.

Luego de un ajuste multivariado entre anemia severa Vs NO anemia severa, se concluye que para la severidad de anemia el factor más importante es el # de días de parasitemia patente con un OR=2.1(IC 95%:1.4 – 3.2) y un p valor=0.001

## 6.4 Análisis de parasitemia, respuesta de la médula ósea y anemia.

Con los valores de referencia establecidos para el recuento reticulocitos, se define respuesta de médula cuando los recuentos resultan mayores a 5.8%, previa corrección del recuento (ajuste entre el hematocrito observado y esperado, para obtener la actividad real de eritropoyesis por día)(28)(29).

**TABLA N° 7:**

### Análisis de parasitemia versus respuesta de la médula ósea en el día 25

Variables	Respuesta MO en d25 (n=4)			No Respuesta MO en d25 (n=12)			p valor
	Mediana	IQR	Min - Max	Mediana	IQR	Min - Max	
Parasitemia en el día 25*	0	0 - 0	0 - 0	2 714	0 - 9100	0 – 173 659	0.02**
Días de <i>clearance</i>	5	5 - 6	4 - 6	0	0 - 3	0 - 7	0.002**

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

\*Expresada en unidades de par/ul.

\*\*Valor “p” obtenido a partir de la prueba Mann- Whitney.

Para estos análisis sólo se trabaja con la data del estudio 4, por presentar mediciones de reticulocitos interdiarias y hasta el final del estudio.

En la **TABLA N° 7** muestra que en el día 25 que el grupo con respuesta de médula ósea no presenta parasitemia y además indica un *clearance* efectivo de la parasitemia, mediana de 5 (IQR:5 – 6) días. Mientras que el grupo “No respuesta MO”, muestra parasitemia y mediana de días de *clearance* de 0 (IQR: 0-3). Las diferencias fueron significativas ( $p<0.05$ )

**TABLA N°8: Análisis de Respuesta de la Médula Ósea frente la anemia**

Variables	Anemia no severa (n=10)	Anemia Severa (n=6)	p valor
	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
<b>Pd25*</b>	0 (0-849)	8065 (2714-14 796)	0.017**
<b>Respuesta25(n, %)</b>			
<b>SI</b>	4(40%)	0(0%)	0.115##
<b>Respuesta27(n, %)</b>			
<b>SI</b>	5(50%)	0(0%)	0.058##
<b>Respuesta29(n, %)</b>			
<b>SI</b>	7(70%)	1(17%)	0.059##

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

\*Parasitemia en el día 25 expresada en unidades de par/ul.

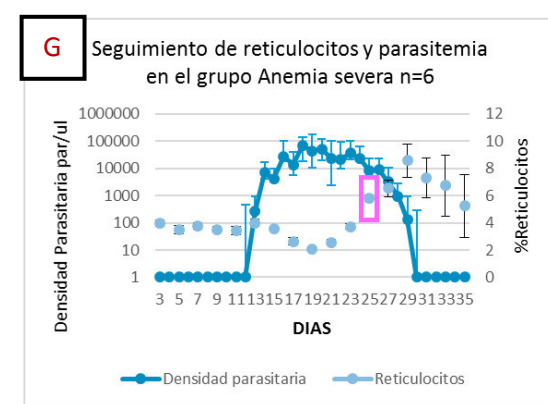
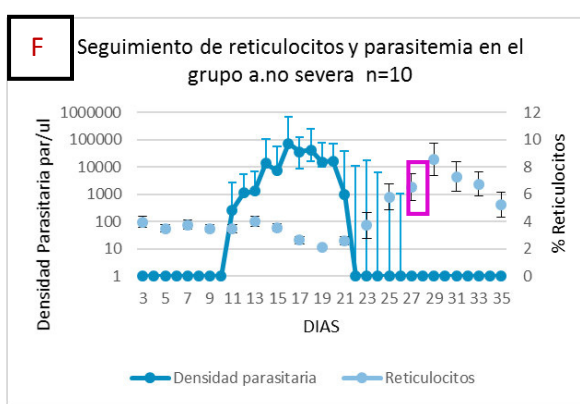
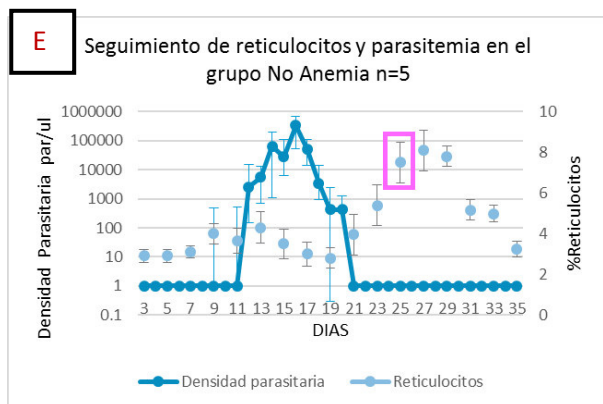
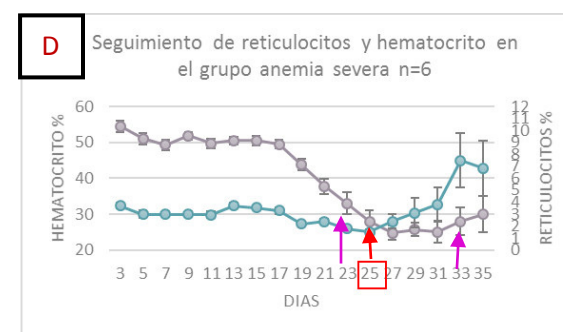
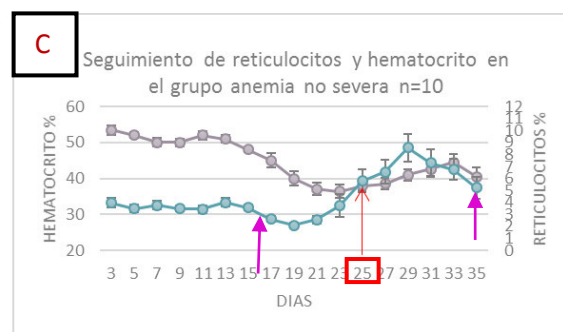
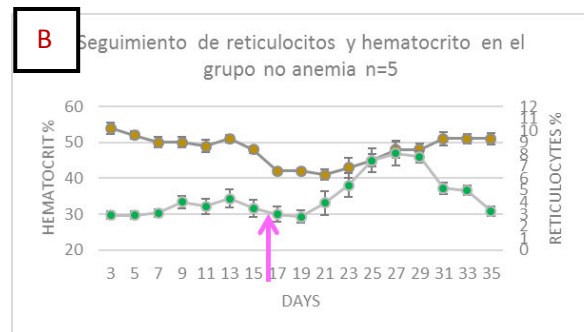
\*\*Valor “p” obtenido a partir de la prueba Mann- Whitney

## Valor “p” obtenido a partir de la prueba Test de Fisher

Se evaluó en 16 monos (compilado, estudio 4), la respuesta de la médula ósea frente la anemia pues dentro del grupo se presentaron casos de anemia severa y no severa.

En la **TABLA N°8**, se aprecia que para el día 25 hay diferencias significativas con respecto a la parasitemia entre el grupo anemia severa y anemia no severa ( $p < 0.05$ ), en el grupo anemia severa no se observan casos de *clearance*. También al evaluar respuesta de la médula ósea tanto en el día 25, 27 y 29 no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), a pesar de estar frente a un estado de anemia, incluso en estado de anemia severa.

A continuación, mostramos gráficos de seguimiento de hematocrito, reticulocitos y parasitemia.



	Grupo	Día Tto	Max retic	Día Retic	Densi Par
T2602	no anemia	16	7.76	29	0
T3261	no anemia	16	10.25	27	0
T3269	no anemia	16	10	25	0
T3225	no anemia	16	8.12	29	0
T3273	no anemia	16	10.31	27	0

	Grupo	Día Tto	Max retic	Día Retic	Densi Par
T3228	a. no severa	19	12.4	29	0
T3288	a. no severa	18	11.5	27	0
T3266	a. no severa	35	4.46	33	0
T3270	a. no severa	16	12.5	25	0
T3223	a. no severa	35	4.47	29	34411.77
T3253	a. no severa	16	14	29	0
T3272	a. no severa	16	12.3	29	0
T3303	a. no severa	23	9.33	31	0
T3284	a. no severa	19	9.75	31	0
T3309	a. no severa	18	10.52	31	0

	Grupo	Día Tto	Max retic	Día Retic	Densi Par
T3249	a.severa	27	5.1	0	0
T3206	a.severa	31	18	35	0
T3271	a.severa	31	4.28	3	0
T3201	a.severa	25	5.57	35	0
T3245	a.severa	23	15.5	33	0
T3231	a.severa	33	4.08	35	0

El p valor al comparar el máximo recuento de reticulocitos entre los 3 grupos  $p=0.55$  y al comparar sólo los casos de anemia  $p=0.51$ . Se trabajó con prueba Mann –Whitney.

Las gráficas B ,C, D muestran mediciones en base a la media con su respectivo error estándar, las flechas rosadas indican moda o rango de tratamiento, flecha roja indica el día común donde se encuentran casos de anemia severa v no severa. En las gráficas E.F.G la parasitemia se expresa como medianas con rango intercuartílico.

## 6. DISCUSIÓN

Hay muchos estudios enfocados en la anemia por malaria falciparum, sin embargo, aún no se tiene muy en claro los mecanismos que contribuye a su desarrollo(2). Así existen estudios previos realizados in vitro, con cohortes de personas(30)(31)(32) y en algunos casos con primates no humanos en un contexto de estudio de vacunas(13)(33).

En este caso el objeto de estudio fue evaluar cómo se relaciona la anemia en una infección por *Plasmodium falciparum* con la parasitemia y con la respuesta de la médula ósea en primates no humanos. Si bien hay dos estudios previos que evalúan anemia y reticulocitos en un similar contexto, en este caso se pretende un enfoque de evaluación diferente.

En la presente investigación, lo primero que se realizó es determinar los valores de referencia para hematocrito y recuento de reticulocitos de acuerdo a los criterios del CLSI(34), a continuación identificar los casos de anemia no severa, anemia severa y categorizarlos, y para el recuento de reticulocitos se determina un punto de corte, a partir del cual podamos considerar cuando hay o no una respuesta de la médula ósea.

Así en caso del hematocrito se obtuvo como intervalo de referencia normal 39 - 60% (media de 49%), los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Umaña (1984), quien determina una media de hematocrito de 52.8% con un rango de 36.8-63.1(35) en el género *Aotus*.

En relación al recuento de reticulocitos en estado basal, se obtuvo como rango de referencia normal 1.9- 5.8%(media de 3.2%), lo cual resultó similar a los hallazgos del estudio de Egan (2002), quien obtiene una media de 2.9%  $\pm$ 2.2%. Mientras que los valores basales determinado por Stewart (2003) fue de 1-5%.(36). Siendo que, en base de la bibliografía consultada, se aceptan y validan los intervalos de referencia hallados en la presente investigación.

A partir de los valores obtenidos de hematocrito, se considera estado de anemia cuando el hematocrito se encuentra por debajo del 39% y anemia severa cuando el hematocrito es menor o igual a la mitad de la media normal, o sea cuando es  $\leq 25\%$ . Además, que un hematocrito del 25% es considerado un punto de corte para tratamiento por motivo de

anemia en varios estudios experimentales para la evaluación de vacunas contra *P. falciparum* en un modelo de *Aotus*.(37)(38)

El presente estudio a diferencia de estudios anteriores de anemia en *Aotus* (Egan y Jones) establece puntos de corte con respecto a hematocrito, para identificar cuando el mono del género *Aotus* empieza a entrar a un estado de anemia no severa y severa. Mientras que Egan (2002) en su estudio de anemia habla sólo de anemia moderada y severa, por otro lado, Jones (2002) en su estudio de anemia también trabaja con hemacrito, pero su análisis se basa sólo en comparación con valores basales de manera individual, y no trabaja con puntos de cortes exactos para clasificar grados de anemia. Después de estandarizar los valores de referencia para hematocrito y reticulocitos se procede a evaluar los objetivos propuestos.

Al evaluar la parasitemia versus anemia, se obtuvo un  $p=0.266$ , lo que indica que no hay diferencias significativas entre alta y baja parasitemia para desencadenar anemia. O sea, ya se tenga una densidad parasitaria alta ( $\geq 200\ 000$  par/ul) o baja ( $< 200\ 000$  par/ul), la posibilidad de desarrollar anemia ante una infección de *P. falciparum*, es la misma. Estos resultados son similares a los obtenidos por Egan (2002). Sin embargo, en nuestro caso todos los monos con anemia severa se encuentran dentro del grupo de baja parasitemia, pero ninguno presentó parasitemia subpatente. Mientras que Egan (2002) si reporta casos de anemia severa con parasitemia subpatente.

Asimismo, al realizar la comparación de los resultados de esta investigación frente a los hallazgos del estudio de anemia de Jones (2002)(33) quien muestra tablas de asociación individuales de hematocritos y parasitemias, se puede apreciar casos de anemia tanto en monos con alta como baja parasitemia, aunque ellos no diferencian entre anemia no severa y severa, solo hacen comparación de hematocritos con respecto a los valores basales. Sin embargo, Jones (2002) evalúa correlación entre máxima parasitemia y mínimo hematocrito en algún momento del seguimiento y no encontró correlación alguna.

Otros aspectos de la tesis, en relación a estudios anteriores, es categorizar la variable anemia y evaluar parasitemia mediante otras variables como: parasitemia total acumulada, días de parasitemia patente.

Al evaluar la parasitemia total acumulada, después de un ajuste multivariado se determina que es un factor importante para el desarrollo de anemia en el modelo Aotus en un estado de infección con *P.falciparum*, con un OR=2.31 (IC 95%: 1.2-4.6)  $p=0.016$ .

Sin embargo, para el desarrollo de anemia severa, # de días de parasitemia patente o “cronicidad” es un factor que muestra mayor impacto, después de un ajuste multivariado con un OR =2.1(IC 95%:1.4 – 3.2) y un  $p$  valor=0.001, entre los casos de anemia severa y no anemia severa.

En cuanto a reticulocitos y parasitemia, se trabajó con 21 individuos. Según nuestro rango de referencia normal, el punto de corte para considerar respuesta de la médula ósea son recuentos de reticulocitos mayores a 5.8%. Entonces en base a la información analizada, se detecta respuesta medular a partir de la tercera semana.

Así al evaluar respuesta medular y parasitemia en el día 25 en el grupo anemia, se aprecia 4 individuos *Con respuesta* cuya mediana de parasitemia fue 0 par/ul (IQR: 0 – 0), frente a una mediana de 2714par/ul (IQR: 0 – 9100) del grupo *Sin respuesta medular*( $n=12$ ); hubo diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0.02$ ). Los resultados obtenidos contrastan con los hallazgos de Jones(2002)(33),sin embargo, Jones (2002) reporta aumento del recuento de reticulocitos, después que la parasitemia decae por debajo de ~ 100 par/ul, las medias de parasitemias comparadas en su caso fueron 118 par/ul vs 507 par/ul ( $p=0.018$ ).

Estos resultados también coinciden con las observaciones de Egan (2002), quien presenta dicha información de manera descriptiva. Asimismo Moreno (2013) obtiene los mismos resultados, sin embargo, él trabajó con *Plasmodium coatneyi* en *Rhesus*, modelo que replica la disfunción multisistémica de malaria severa en humanos.(40)Trabajó con 5 *Rhesus* naive con 30 días de seguimiento en un contexto de no vacunas. Sus reportes lo

hacen mediante unas gráficas de seguimiento de medias de recuentos de reticulocitos  $\pm$  DS.

Finalmente se evalúa respuesta de la médula ósea y parasitemia en un contexto de anemia. En la exploración de los datos, se determina iniciar el análisis a partir del día 25 (fecha de presentación común de casos anemia no severa y severa); del modo que al evaluar la respuesta medular entre el grupo de anemia no severa (n=10) versus severa (n=6) en los días 25, 27 y 29. En el día 25, el grupo anemia no severa, 40 % de casos registra respuesta medular, mientras que los casos de anemia severa ninguno responde. Para el día 27, el 50 % de casos de anemia no severa registra respuesta; mas el grupo de anemia severa no mostró cambios. Y el día 29, 70% de casos de anemia no severa muestra respuesta medular, y del grupo anemia severa sólo 17% responde. Sin embargo, no se demostró diferencias significativas entre ambos grupos ( $p>0.05$ ).

A partir de los resultados, se evidencia que la respuesta fisiológica adecuada, frente a un contexto de anemia, debería ser una pronta respuesta de la médula ósea para compensar la pérdida; más aún ante una anemia severa. Sin embargo, en un estado de infección por *Plasmodium falciparum* esto no se aprecia. A pesar que hay casos de respuesta en el grupo de anemia no severa, no todos responden al mismo tiempo estando bajo las mismas condiciones, lo que indica que existen otros factores que influyen.

Del análisis anterior, en anemia se procede a evaluar parasitemia y días de clearance de acuerdo a la presencia o ausencia de respuesta de la médula ósea. Se halla que los individuos que presentan respuesta de la médula ósea son aquellos que no presentan parasitemia y al menos 5 días de *clearance* (frente al grupo que no evidencia respuesta), de acuerdo al análisis estadístico hubo diferencias significativas entre ambos grupos ( $p<0.05$ ). Esto coincide con los reportes de Abdalla (2004)(41) y Camacho (1998)(30), quien reporta un recuento de reticulocitos normal o disminuido ante un inapropiado grado de anemia, y una reticulocitosis seguida 5 días después de un tratamiento efectivo en caso de malaria aguda (hallazgos reportados en humanos), incluso afirma que una reticulocitosis seguida al tratamiento es signo de un efectivo clearance del parásito.



## 7. CONCLUSIONES

- El intervalo de referencia de hematocrito para el grupo de estudio fue 39-60%
- De los 74 monos que ingresaron al estudio, el 73% desarrolló anemia, de este grupo el 30% desarrolló anemia severa.
- De los 74 monos de estudio, el 35% desarrolló alta parasitemia y 65% baja parasitemia, de los cuales desarrollaron anemia respectivamente 21(39%) y 33(61%).
- El nivel de parasitemia, no es tan importante para el desarrollo de anemia.
- La parasitemia total acumulada es importante para el desarrollo de anemia.
- Los # de día de parasitemia patente es un factor más importante para el desarrollo de anemia severa.
- El intervalo de referencia para reticulocitos hallados para el grupo de estudio fue 1.9-5.8%
- En anemia severa como anemia no severa por *P. falciparum*, se halla la misma cinética de la respuesta de la médula ósea, que se evidencia después de un efectivo clearance. Se concluye que la inhibición de la respuesta de la médula ósea ante el estado de anemia contribuye, pero no es un factor primordial para el desarrollo de anemia severa.
- Con respecto a parasitemia y respuesta de la médula ósea se halla que hay una relación inversa. La médula ósea no responde hasta que haya una total eliminación de la parasitemia.
- En cuanto a la relación parasitemia, respuesta de la médula ósea y anemia, se observa que a pesar de estar en estado de anemia no se evidencia respuesta de la médula ósea, aún si hay parasitemia presente, incluso debe pasar varios *días de clearance* o efectivo tratamiento.

## 8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios futuros sólo enfocados en anemia por infección de *P. falciparum* en el modelo *Aotus*, donde se pueda realizar pruebas complementarias de bioquímica como medición de hierro, haptoglobina, LDH, bilirrubina en diferentes puntos del seguimiento de la cinética de la parasitemia. La bioquímica es necesaria para evaluar que tan importante es el factor hemolítico para el desarrollo de anemia, además aún no hay estos estudios en el modelo *Aotus*.
- Para evaluar la respuesta de la médula ósea a parte de evaluar de manera indirecta en base de recuento de reticulocitos, se debe de realizar estudios directos: un basal, uno durante el periodo de pico de parasitemia, y otro después del clearance. Igualmente, no hay reportes de este tipo de estudio realizados en *Aotus*, pero previo a ello es necesario aplicar una metodología que de hecho será invasiva, pero que no implique el sacrificio del animal. Lo cual es complicado, porque son animales muy pequeños, sin embargo, en la literatura se encuentra la práctica de un método de aspirado seguro, realizado por un grupo de malaria de Colombia, estudio encabezado por Llanos(2006)(42).
- Derrepente la “cronicidad” genera una respuesta inmunológica exacerbada o diferente que pronuncia el decremento del hematocrito en porcentajes  $\leq 50\%$ . Habría que hacer otros estudios para confirmar ello en el modelo *Aotus*.
- A la par del estudio de “cronicidad” de la infección, se debería complementar con un diferencial en cuanto a la respuesta de los linfocitos e interluquinas poniendo énfasis en aquellas que de algún modo interaccionan con la médula ósea.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Michael J. Severe Malarial Anemia : Innate Immunity and Pathogenesis. 2011;
2. Haldar.k M. Malaria,erythrcytic infection, and anemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;1(574):87–93.
3. Svendsen P, Hau J. Handbook of Laboratory Animal Science Vol III. 2002.
4. WHO. World malaria report 2016. 2016.
5. WHO. Country profiles. 2014;
6. Program RM. Situation of Malaria in the Region of the. 2013;
7. Blumberg BS. Boletín Epidemiológico (Lima). 2014;23(33):650–66.
8. World Health Organisation. Management of severe malaria. 2012.
9. Hau J, Hoosier GL Van. Handbook of Laboratory Animal Science vol II. 2003.
10. Baer JF, Weller RE, Kakoma I. The Owl Monkey. 1994.
11. Linda J Lowenstine. The Laboratory Primate. 2005.
12. Collins W. Nonhuman Primate Models. Methods. 1996;72:85–92.
13. Egan AF, Fabucci ME, Saul A, Kaslow DC, Miller LH. Aotus new world monkeys: Model for studying malaria-induced anemia. Blood. 2002;99(10):3863–6.
14. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell D a, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, et al. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. Q J Med. 1986;58(227):305–23.
15. Buffet P a, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Puijalon O, David PH. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. Curr Opin Hematol. 2009;16:157–64.
16. Haldar.k M. NIH Public Access:,Malaria,erythrocytic infection, anda anemia. Hematology. 2010;(574).
17. Carvalho LJDM, Alves FA, Oliveira SG De, Fernandes A a M, Pereira J a, Muniz C, et al. Severe Anemia Affects Both Splenectomized and Non-Monkeys. 2003;98(July):679–86.
18. Ekvall H. Malaria and anemia. Curr Opin Hematol. 2003;10(2):108–14.
19. Renato P, Totino R, Magalhães D, Alves EB, Regina M, Costa F, et al. Plasmodium falciparum , but not P . vivax , can induce erythrocytic apoptosis. 2014;1–6.
20. Totino PRR, Magalhães AD, Silva LA, Banic DM, Daniel-ribeiro CT.

- Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malar J. BioMed Central Ltd*; 2010;9(1):350.
21. Greenberg PL, Gordeuk V, Issaragrisil S, Siritanaratkul N, Fucharoen S, Ribeiro RC. Major hematologic diseases in the developing world- new aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and acute leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;479–98.
  22. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Bailliere's Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13(2):277–99.
  23. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JOP, Williams S, Lowe B, Nyanoti M, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood*. 2006;108(8):2569–77.
  24. Aguilar R, Moraleda C, Achtman AH, Mayor A, Quintó L, Cisteró P, et al. Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol*. 2014;164(6):877–87.
  25. CLSI. EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. 2010.
  26. Galland GG, Morris CL, Sullivan JS, Roberts JM, Collins WE. Changes in Hematologic Values During Infection of New World Monkeys With *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. 1998;86–8.
  27. Ibulaimu Kakoma MJ and col. Platelet Kinetics and Other Hematological Profiles in Experimental *Plasmodium falciparum* Infection: A Comparative Study between Saimiri and Aotus Monkeys. 1992.
  28. Bessman JD. Clinical Methods: The history, Physical and Laboratory examinations. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW editors., editor. 3rd ed. Boston; 1990.
  29. Bain B. Blood Cells: A Practical Guide. 4th ed. Khan M, editor. London; 2006.
  30. Camacho H. The course of anaemia after the treatment of acute , *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;92(5):525–38.
  31. Leowattana W. Defective Erythropoietin Production and. *Southeast Asia J Trop Med Public Heal*. 2008;66(0):581–8.
  32. Fendel R, Brandts C, Rudat A, Kreidenweiss A, Steur C, Berdel WE, et al. Hemolysis Is Associated with Low Reticulocyte Production Index and Predicts Blood Transfusion in Severe Malarial Anemia. *PLoS One*. 2010;5(4):1–8.
  33. Jones TR, Stroncek DF, Gozalo AS, Obaldia N, Andersen EM, Lucas C, et al. Anemia in parasite- and recombinant protein-immunized Aotus

- monkeys infected with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):672–9.
34. CLSI. EP28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. 2010.
  35. Umaña JA., Jairo Ramírez C, Espinal CA., Sabogal ME. Primates No Humanos Para Investigación Y Mantenimiento De *Aotus lemurinus griseimembra*. *Bol Sanit Panam*. 1984;97(I):44–53.
  36. Stewart VA. *Plasmodium vivax* under the microscope: The *Aotus* model. *Trends Parasitol*. 2003;19(12):589–94.
  37. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long C a., Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun*. 2002;70(12):6961–7.
  38. Cavanagh DR, Kocken CHM, White JH, Cowan GJM, Samuel K, Dubbeld MA, et al. Antibody Responses to a Novel *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein Vaccine Correlate with Protection against Experimental Malaria Infection in *Aotus* Monkeys. *PLoS One*. 2014;9(1).
  39. Abdalla S. The Anaemia of *P. falciparum* Malaria. *Br J Hematol*. 1980;171–83.
  40. Moreno A, Cabrera-Mora M, Garcia AP, Orkin J, Strobert E, Barnwell JW, et al. *Plasmodium coatneyi* in rhesus macaques replicates the multisystemic dysfunction of severe malaria in humans. *Infect Immun*. 2013;81(6):1889–904.
  41. Saad Abdalla and Geoffrey Pasvol. *Malaria A Hematological Perspective*. 2004th ed. Stephen Hoffman and Geoffrey Pasvol, editor. London: Imperial College Press; 2004.
  42. Llanos C, Quintero G, Castellanos A, Arevalo-herrera M. Surgical bone marrow aspiration in *Aotus lemurinus griseimembra*. *J Med Primatol*. 2006;131–5.
  43. Rodak B. *Hematología: Fundamentos y Aplicaciones clínicas*. 2 nd. Panamericana, editor. Philadelphia; 2004.

## 10. ANEXOS

### a) INFECCIÓN DEL DONADOR Y ENFRENTAMIENTO

---

Del grupo de monos seleccionados para el estudio se elige uno para ser infectado antes que los demás, este será el mono donador o donador.

- 4 días antes de infectar a los demás monos, el mono donador debe ser infectado con cepa FVO de *Plasmodium falciparum*.
- 3 días después de la infección debe ser seguido el desarrollo de la parasitemia a la vez con monitorización del hematocrito.
- Al cuarto día después de la infección o en el primer día cuando el mono desarrolle una parasitemia que exceda el 0.5%, entonces se colecta 1 ml de sangre a partir de la vena femoral, anestesiando al mono para determinar la cantidad de parásitos de acuerdo al hematocrito.
- Se prepara una suspensión de Glóbulos rojos frescos parasitados, en una concentración de  $1 \times 10^4$  obtenidos del donante en 1 ml de Buffer Fosfato Salino.
- Después el resto de los animales son enfrentados con el parásito, y el donante es tratado con mefloquina.

### b) MANIPULACIÓN Y MANEJO DEL MONO

---

- Para los procesos de inoculación de la cepa FVO y toma de muestra para monitoreo de los animales siempre el animal será sujetado con el retenedor estándar para monos y en casos que sea complicada la manipulación de los animales se procederá a tranquilizarlos usando Ketamina (15-20 mg / kg) vía intramuscular.
- Para todo sangrado se anestesia al animal y se usa jeringa No 25-29 de 1/2 pulgada.

*c) MONITORIZACIÓN DE LA PARASITEMIA POST-ENFRENTAMIENTO*

---

- A partir del día 3 post-infección hasta el final del estudio (día 35 post-enfrentamiento), todos los días se realiza la monitorización de la parasitemia mediante preparación de frotises coloreados con Giemsa.
- Tanto para la evaluación de parasitemia, reticulocitos y hematocrito se obtiene 100 ul de sangre, usando una jeringa de tuberculina a partir de la vena femoral, previa sedación del animal con Ketamina
- Para evaluar parasitemia sólo es necesario 10 ul de sangre por mono.
- La lectura en periodo pre-patente se barren 40 campos, o sea se evalúa 10000 eritrocitos.
- Cuando la parasitemia ya se hace evidente sólo es necesario evaluar 2000 eritrocitos.

*d) MONITORIZACIÓN DEL HEMATOCRITO POST-ENFRENTAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE CASOS DE ANEMIA*

---

- Para ello solo es necesario 50ul de sangre por mono.
- Se evalúa por el método de microhematocrito.
- La monitorización se realiza de manera interdiaria a partir del día 0 hasta el día 35 del seguimiento.
- Hallar los valores de referencia de hematocrito con los valores basales antes del enfrentamiento, siguiendo las recomendaciones del protocolo CLSI EP28-A3C (2010), y hallar la media de hematocrito normal. En base a ello definir los casos de anemia y anemia severa.

### **Coloración y recuento**

- Para esta evaluación la cantidad de sangre requerida es de 10 ul por mono y 10 ul de colorante ReticChex.
- En este caso la evaluación será por método manual. Y los pasos a seguir son:
  - Mezclar v/v de sangre y colorante.
  - Incubar a temperatura ambiente entre 15 a 30 min
  - Proceder a realizar láminas
  - Realizar el recuento en base a 1000 eritrocitos y sacar el porcentaje.

### **Estandarización de valores de referencia y corrección de recuento.**

- Realizar el recuento de reticulocitos basales de los monos que serán sometidos a la infección.
  - Determinar los valores de referencia para recuento de reticulocitos para este grupo de estudio. Siguiendo las recomendaciones del CLSI(25)
  - Determinar los criterios de individuos sanos para este caso.
  - Evaluar normalidad de la data
  - Hallar el percentil 97.5 y 2.5



- Cuando se evalúe toda la data en los casos de anemia realizar la corrección del recuento de reticulocitos con la siguiente fórmula:

$$RC = \frac{\%R \times \text{Hto real}}{\text{Hto normal}}$$

Hto normal: Es considerada la media o promedio normal (43).

Hto real: Valor de hematocrito en caso de anemia.

*f) CRITERIOS DEL CLSI PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE VALORES DE REFERENCIA SEGÚN EL PROTOCOLO EP28 -A3C (2010)*

---

- Definir y determinar los criterios de individuos sanos para este caso. Para nuestro caso nuestra definición de individuo sano es aquel que cumple con los siguientes criterios:
  - Pruebas bioquímicas y hematológicas normales
  - No reactivo al PPD
- Criterio de normalidad de la data
- Determinación de los percentiles 97.5 y 2.5 con un intervalo de confianza al 90 o 95%

g) TABLA DE DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

	Excluidos(n=45)		Incluidos(n=74)		p valor
<b>Edad en meses</b> (Mediana,IQR)	20	16 -28	18	14 -23	0.604
<b>Peso Basal</b> (Mediana,IQR)	840	766 - 950	870	758 - 990	0.634
<b>*Parasitemia total acumulada</b> (Mediana,IQR)	473 176.9	346 490.1-618 372.6	410 956.8	101 720.6 - 679 080	1.000
<b>Nivel de parasitemia</b> (n,%)					0.001
Alta parasitemia(>=200 000par/ul)	34	75.56	26	35.14	
Baja parasitemia(<200 000 par/ul)	11	24.44	48	64.86	
<b>Sexo</b> (n, %)					0.803
Macho	16	35.56	28	37.84	
Femenino	29	64.44	46	62.16	
<b>Estado de inmunizacion</b> (n,%)					0.012
inmunizado	24	53.33	56	75.68	
naïve	21	46.67	18	24.32	
<b>Tipo de Estudio</b> (n,%)					0.019
Estudio 1:Vacuna RH5	13	28.89	18	24.32	
Estudio 2:VacunaAMA1 RON2	8	17.78	14	18.92	
Estudio 3:Vacuna AMA1 RON2(cepa P. falciparum FCH4)	13	28.89	12	16.22	
Estudio 4:Anticuerpo RH5(2015)	2	4.44	21	28.38	
Estudio 5: Anticuerpo RH5(2016)	9	20.00	9	12.16	

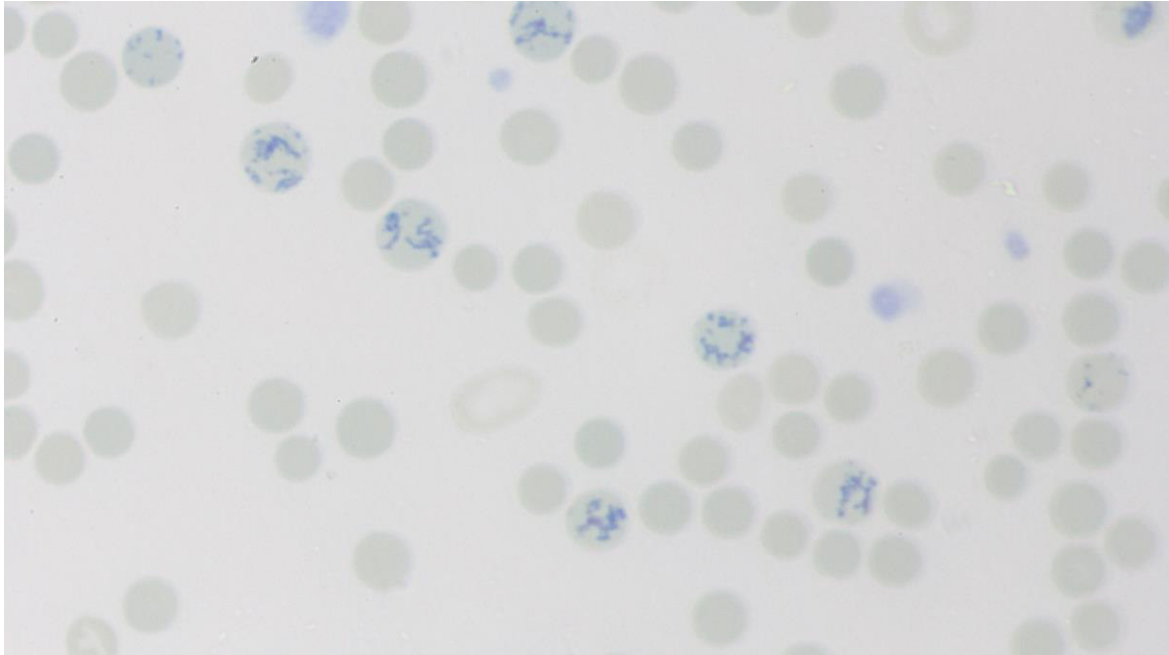
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA. Las pruebas usadas fueron Chi-cuadrado, Fisher y Mann-Whitney

#### h) OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL	DIMENSION	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR	VALORES ESPERADOS	FUENTE DE INFORMACIÓN
Parasitemia	Presencia de estadios asexuales de Plasmodium falciparum en sangre periférica	Evaluación por microscopia del frotis de sangre periférica coloreado con Giemsa al 10%	Análisis de laboratorio	Cuantitativa	De razón	Densidad Parasitaria Pico de parasitemia Parasitemia acumulativa total Periodo prepatente Clearance	0 -200 000par/ul >200 000par/ul Ó 0-5% , ≥5% Parasitemia más alta del seguimiento Suma de todas las parasitemias del seguimiento # días hasta la aparición de la primera parasitemia # días sin parasitemia después del tratamiento	Sangre de mono Aotus Nancymae
Anemia	Estado patológico que puede ser definido en este caso como una disminución del hematocrito fuera de los rangos referenciales	Evaluado de manera manual por el método microhematocrito	Análisis de laboratorio	Cuantitativa	Intervalo	Hematocrito	Rango de referencia <rango de referencia ≤Media Hto normal/2	Sangre de mono Aotus Nancymae
Respuesta de la médula ósea frente la anemia	Respuesta fisiológica ante pérdida considerables de glóbulos rojos	Recuento manual de reticulocitos por microscopía a partir de un frotis de sangre periférica coloreado con Retic chex	Análisis de laboratorio	Cuantitativa	Intervalo	Reticulocitos	Valores de referencia por estandarizar ><v. referencia	Sangre de mono Aotus Nancymae

i) IMÁGENES

---



Reticulocitos de *Aotus* coloreados con Retichex con un amplificación de 1000X. Tomada con cámara Canon modelo EOS 60D 18MP.